

Universidad: Universidad Nacional de La Plata

Facultad: Facultad de Ciencias Exactas – Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos

Título del Trabajo Capacidad formadora de películas interfaciales de proteínas de amaranto para su aplicación en alimentos funcionales espumados.

Autor: Agustín J. Bolontrade

Nivel de formación del investigador principal: Graduado

Orientador: María C. Añón

Comité Académico: Agroalimentario.

Correo del Autor Principal: bolontrade@gmail.com

Palabras Claves: Amaranto, Proteínas, Interfases

RESUMEN

El Amaranto es un pseudocereal originario de Latinoamérica que desarrolla fácilmente en suelos áridos y posee semillas con proteínas de reserva de alto valor nutricional y actividades biológicas de interés para la salud del consumidor. Estas características han motivado, en nuestro caso, el interés en el estudio de las propiedades interfaciales de estas proteínas para su posible aplicación en el desarrollo de productos nutracéuticos y alimentos funcionales espumados.

Las semillas se molieron para obtener harina, a partir de la cual se obtuvo un aislado proteico por extracción en medio alcalino y posterior precipitación a pH . Se analizaron las características estructurales de las proteínas en soluciones ácidas y básicas con distinto contenido salino y luego se estudió la capacidad de difusión, adsorción y reordenamiento de las proteínas en la interfase aire/agua, procesos necesarios para la generación de una espuma. En condiciones ácidas se lograron resultados alentadores, los cuales permiten pensar en una posible utilización de estas proteínas en la industria alimentaria.

INTRODUCCION

En la actualidad varias investigaciones se han enfocado en la búsqueda de nuevos recursos proteicos para satisfacer las demandas de alimentos (1). En este contexto las proteínas vegetales se perfilan como una alternativa promisorio para sustituir parcialmente la proteína animal en la nutrición humana (2). Las semillas de amaranto presentan un alto contenido de proteínas de reserva (14-19 %) (3) con una composición aminoacídica superior a la de otros cereales y legumbres, la misma es rica en lisina y metionina, dos aminoácidos limitantes en la dieta humana (4, 5). Se han descripto algunas actividades biológicas de las proteínas y péptidos de amarando, que permiten pensar en una utilización de estas en el desarrollo de productos nutracéuticos y alimentos funcionales. (6, 7)

Para desarrollar un alimento espumado se hace necesario conocer las propiedades interfaciales del agente tensoactivo que se desea emplear en la formulación. Dentro de estas propiedades, considerando la formación de la espuma la más importante resulta ser la velocidad de descenso de la tensión interfacial (8), la cual es consecuencia de varios procesos que llevan a la proteína del seno de la solución a la interfase. Varios de estos procesos se relacionan con las características estructurales de las proteínas (9, 10). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron buenos resultados en la capacidad emulsificante de las proteínas de amaranto en condiciones ácidas (11)

OBJETIVO

Este trabajo tuvo como objetivo el estudio de las características estructurales de proteínas de amaranto en solución, y las cinéticas de difusión, adsorción y reordenamiento en la interfase aire/agua en diferentes condiciones de estado acido-base (pH) y fuerza iónica (μ). Las mismas se relacionaron con algunos parámetros que permiten evaluar las propiedades espumantes de las soluciones proteicas a efectos de evaluar su potencial aplicación en el desarrollo y mejoramiento de alimentos funcionales espumados.

MATERIALES Y METODOS

Preparación del aislado proteico

El aislado proteico se preparó a partir de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (cultivar 9122) obtenidas en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Anguil, La Pampa, Argentina, las cuales fueron molidas en una (0,092 mm mesh). La harina obtenida se desgrasó con hexano a 4 °C durante 24 h (100 g/L) con agitación continua, luego se secó a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C hasta su utilización. La harina desgrasada se suspendió en agua (100 g/L) ajustando el pH a 9,0 con NaOH 2N. La suspensión se agitó durante 60 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 9000g durante 20 min a 15 °C. El sobrenadante se ajustó a pH 5 con HCl 2N y se centrifugó

a 9000g durante 20 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en agua, se neutralizó su estado ácido-base y se liofilizó para su almacenamiento a 4 °C hasta su uso (12). El contenido proteico obtenido fue 75 ± 1 % p/p, el mismo se determinó por la técnica de Kjeldahl (AOAC, 1984), $f=5.85$ (13).

Preparación de las soluciones proteicas.

Las soluciones proteicas se prepararon en cuatro condiciones de estado ácido-base (pH) y fuerza iónica (μ). pH 2, μ 0,06 (26,5 mM H_3PO_4 ; 23,4 mM NaH_2PO_4 ; 6,58 mM NaCl); pH 2, μ 0,5 (8,6 mM H_3PO_4 ; 8,8 mM NaH_2PO_4 ; 241 mM NaCl); pH 8, μ 0,1 (1,1 mM NaH_2PO_4 ; 16,3 mM Na_2HPO_4); pH 8, μ 0,5 (0,8 mM NaH_2PO_4 ; 16,6 mM Na_2HPO_4 ; 199 mM NaCl). Las dispersiones se agitaron durante 1h a temperatura ambiente en la relación necesaria (p/v) para llegar a la concentración 1 g/L de proteína soluble. Se centrifugaron a 10000g, 15 min. 25 °C, y se recuperó el soluble el cual se diluyó para obtener las diferentes concentraciones de trabajo.

Solubilidad

Se determinó por duplicado a partir de dispersiones 1 g/L en las diferentes soluciones tampón. Las muestras se incubaron 1 h a 25 °C mientras fueron agitadas a máxima velocidad en vortex durante 4 s cada 15 min. Las dispersiones se centrifugaron a 10000g, 15 min. 25°C. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó por el método de Lowry y col..(14) por duplicado. La solubilidad se expresó como:

$$\% \text{ proteína soluble} = \frac{\text{proteína soluble}}{\text{proteína total}} \times 100$$

Electroforesis

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio con y sin pretratamiento con beta-mercaptoetanol siguiendo el procedimiento descrito por Martínez *et al.* (15). Las soluciones se diluyeron en una solución tampón fosfato 35 mM (pH 7,8; μ 0,1; dodecilsulfato de sodio) en una concentración final 20-30 g/L. Las muestras se centrifugaron a 12000g durante 10 min y se sembraron 10 μ L de la fracción soluble en cada calle. La corrida se realizó manteniendo 30 mV constante. La tinción se realizó con Coomassie Brilliant Blue.

Dicroísmo Circular

Las medidas se realizaron en un espectropolarímetro Jobin-Yvon CD6 (Jovin-Yvon SA, Longjumeaux, Francia) en el uv lejano (190-250 nm). Las soluciones de proteína 1 g/L se vertieron en celdas de cuarzo con un paso de luz de 0,1 mm. La diferencia entre la absorbancia de las dos componentes circularmente polarizadas se graficó en función de la longitud de onda. Para la interpretación de los resultados se utilizaron los espectros típicos de las estructuras secundarias conocidas (16)

Distribución de tamaño de partículas

La distribución de tamaño de partículas se obtuvo de la función de correlación temporal (10^{-6} - 10^3 s) obtenida de la intensidad de luz dispersada a un ángulo fijo con el goniómetro ALV/CGS-5022F y adquisidor ALV-5000/EPP. La fuente de luz láser fue helio/neon y se trabajó a 22 mW. Todas las muestras fueron filtradas a través de un filtro de tamaño de poro de 5 μ m. La distribución tamaños en masa fue calculada asumiendo distribución de Rayleigh (17).

Difusión a la interfase aire/agua.

Se trabajó sobre soluciones proteicas de concentración 0,1; 0,01 y 0,001 g/L en donde la difusión de la proteína a la interfase es limitante en el proceso de anclaje. Las medidas se realizaron en un tensiómetro de gota dinámico (Tracker, IT-Concept. Saint-Clémenttes Places, Francia). La burbuja se formó en la solución de proteína y se evaluó la tensión superficial en el tiempo en base a cambios en la forma axial de la gota de acuerdo al modelo de Laplace (18, 19). El coeficiente de difusión (k_{diff}) se estimó aplicando la ecuación de Ward y Torday modificada (20).

Adsorción y reordenamiento en la interfase aire/agua.

Se evaluó sobre soluciones 1 g/L en un tensiómetro de gota LAUDA TVT2 en modo dinámico. Se formaron gotas pendientes a diferentes velocidades constantes, la tensión interracial aire/agua fue calculada asumiendo la compensación de la fuerza de gravedad y la tensión superficial de la gota al momento del desprendimiento. La ecuación de primer orden bifásica $\gamma(t) = \gamma_a e^{-k_a t} + \gamma_r e^{-k_r t} + \gamma_e$ (21) se ajustó a los datos experimentales estimando las constantes de velocidad de adsorción y reordenamiento (k_a , k_r) y las amplitudes de dichos procesos respectivamente (γ_a , γ_r). La amplitud del descenso de la tensión a los 3 segundos (3 s) se obtuvo interpolando en el modelo y se expresó como el aumento en la presión superficial ($\gamma(0s) - \gamma(3s)$).

Propiedades espumantes.

Las propiedades espumantes se determinaron mediante el método conductimétrico desarrollado por Loisel y col (22). La espuma se formó por burbujeo de N_2 (80 ml/min durante 30 s) a través de un disco fritado (G4) en 6 ml de solución proteica (0,25; 1 y 5 mg/ml). Entre los parámetros de medida de formación de espuma se calculó la densidad de la espuma al final del burbujeo (líquido incorporado en la espuma (VLE)/ volumen de espuma (V_{esp})) y la velocidad máxima de incorporación de líquido a la interfase (v_o), la cual se obtuvo del valor máximo de $d(\text{líquido incorporado})/d(t)$. El VLE se obtuvo de la ecuación $VLE(t) = (6 \text{ ml} [1 - (C_t/C_{init})])$ y el V_{esp} de la lectura visual de la columna graduada. Los ensayos se realizaron por triplicado.

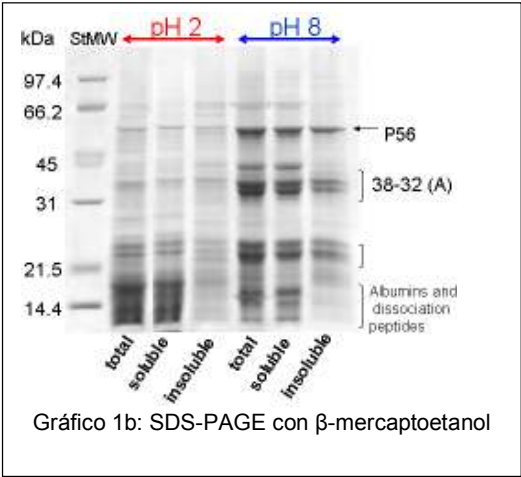
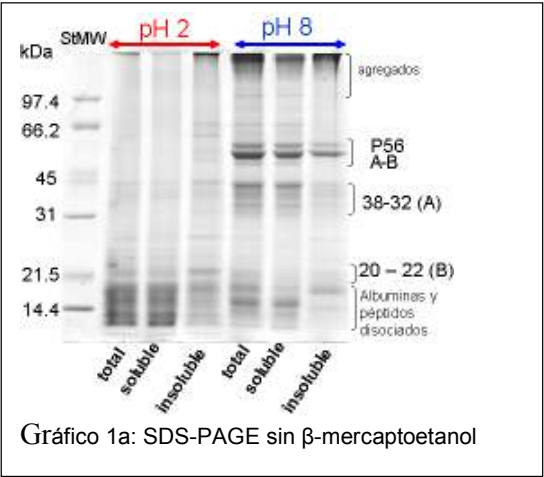
Imágenes de las espumas.

Las mismas se obtuvieron al momento de detener el burbujeo con una cámara webcam (Creative, resolución 320x256 pixeles) con un error de +/- 1 s en la captura.

RESULTADOS

Caracterización de las proteínas solubles y totales.

El perfil electroforético del aislado proteico a pH 2 es diferente del correspondiente a pH 8, detectándose la ausencia de los polipéptidos típicos de las proteínas de amaranto (56 kDa, 54 kDa, 38 kDa, 32 kDa, 22 kDa, 20 kDa) (15). Los perfiles de la fracción soluble y del total fueron muy semejantes entre sí, difiriendo más el correspondiente a la fracción insoluble en la que se detectaron bandas de masa molecular cercana a 66,2 kDa, 45 kDa y 21,5 kDa y algunos polipéptidos de menor masa molecular en mucha menor proporción que en la fracción soluble y el total.

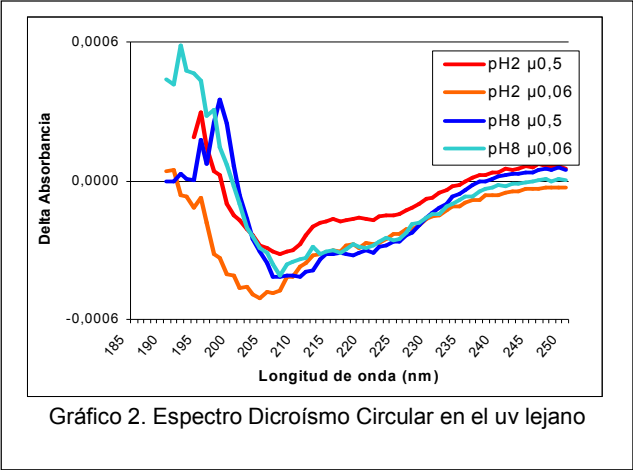


Al variar la fuerza iónica no se observaron diferencias significativas en el perfil electroforético como las detectadas con el cambio de pH.

	pH 2	pH 8
μ0.06	87±3	70±4
μ0.5	25.3±0.4	59±1

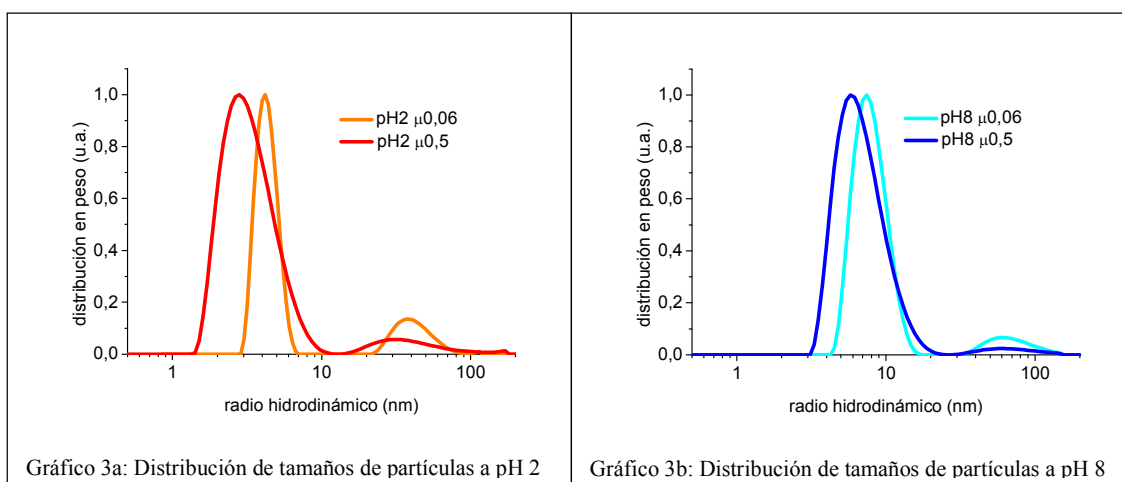
Tabla 1: solubilidad %

Al analizar la solubilidad (Tabla 1) de los aislados, se pudo observar un descenso de la misma con el aumento de la fuerza iónica. Este descenso fue más marcado a pH 2 que a pH 8.



La técnica de dicroísmo circular permite interpretar la estructura secundaria de proteínas en relación a los espectros típicos de estructuras conocidas. Dado que en nuestro estudio cada solución es una mezcla de proteínas con diferentes estructuras, las cuales contribuyen al

espectro resultante, nos limitamos a analizar cambios relativos entre muestras sin posibilidad de estimar las proporciones en las que se encuentran las diferentes estructuras secundarias típicas. A pH 8 (Gráfico 2) no se observaron diferencias significativas entre los espectros a las distintas fuerzas iónicas ensayadas, lo cual permite suponer una composición y/o estructura similar de las proteínas de la fracción soluble en ambas condiciones. A pH 2 se observa un cambio en el espectro al aumentar la concentración salina, se detectó la aparición de un pico a 195nm y el corrimiento del mínimo de 205 a 208 nm, atribuible a un incremento de estructura hoja β -plegada a expensas de estructura desorganizada (random coil).



Al analizar la distribución de tamaño de partículas (Gráfico 3 a y b) se puede observar que las cuatro soluciones presentaron una distribución de tamaños bimodal con dos poblaciones de partículas bien definidas. A pH 2 y μ 0,06 se encontró que el 69% de la masa de las proteínas en solución formaba parte de la segunda población (10-100 nm), con el 31% de la masa restante componiendo la población de menores tamaños (1-10 nm). Al aumentar la fuerza iónica se detectó un desplazamiento de ambas poblaciones hacia menores tamaños con un aumento relativo de la masa en la primer población (49%) con respecto a la segunda (51%). A pH 8 se observó un aumento medio de los radios hidrodinámicos de ambas poblaciones con respecto a pH 2, con igual efecto al aumentar la fuerza iónica, es decir un desplazamiento de ambas poblaciones a la izquierda y enriquecimiento relativo con partículas de menores radios hidrodinámicos.

De la solución a la interfase

A bajas concentraciones de proteína en solución (0,001; 0,01 g/L) se observó un periodo lag, también llamado tiempo de inducción, durante el cual la proteína alcanza una concentración crítica para comenzar a descender la tensión superficial (23, 24). (Tabla 2). Al

	Concentraciónn (g/L)	Periodo lag (min)	k _{diff} (mN/m√t)
pH2 μ0.5	0.001	12.2	1.85 (0.995)
	0.01	0.1	5.61 (0.998)
	0.1	-	-
pH2 μ0.06	0.001	64.3	1.52 (0.991)
	0.01	3.7	3.74 (0.994)
	0.1	ND	ND
pH8 μ0.5	0.001	21.3	1.45 (0.996)
	0.01	2.7	2.97 (0.993)
	0.1	-	8.70 (0.994)
pH8 μ0.06	0.001	21.7	1.43 (0.997)
	0.01	4.1	3.13 (0.992)
	0.1	ND	ND

Tabla 2: Periodo lag y k_{diff} en las soluciones de pH 2 y 8, y μ 0,06 y 0,5 a concentraciones 0,001; 0,01 y 0,1 g/L

aumentar la concentración de proteína se observó una disminución en el periodo lag, alcanzandose más rápidamente la concentración crítica en interfase. A baja fuerza iónica el período lag a pH 2 fue mayor que a pH 8, mientras que a alta fuerza iónica se observó un resultado opuesto, debido a un descenso del tiempo lag a pH 2 al incrementarse la

concentración salina.

A concentraciones 0,001 y 0,01 g/L la adsorción estuvo limitada por la difusión de la proteína a la interfase. A pH 2 la k_{diff} fue mayor que a pH 8, y aún mayor a alta fuerza iónica. En soluciones de 1 g/L la difusión proteica dejó de ser limitante en el proceso de adsorción. A esta concentración la limitación comienza a deberse al proceso de penetración y anclaje, (comúnmente denominados en conjunto adsorción) y desplegamiento de la proteína en la interfase aire/agua (Tabla 3).

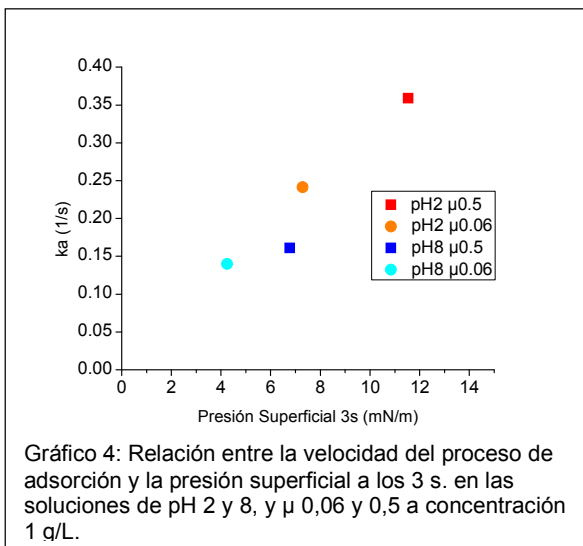
La velocidad de adsorción de la proteína a la interfase fue mayor a pH 2 que a pH 8, y más aún a alta fuerza iónica, misma condición en la cual se observó mayor amplitud del fenómeno a ambos pHs.

	Y _a	k _a	Y _r	k _r	γ(3s)	γ(∞)
pH2 μ0.5	17.3±1.6	0.359±0.027	3.71±0.16	0.01019±0.00088	60.47±0.41	50.98±0.16
pH2 μ0.06	13.9±1.1	0.241±0.021	4.26±0.23	0.0100±0.0010	64.71±0.62	53.79±0.22
pH8 μ0.5	17.1±1.3	0.161±0.021	8.10±0.68	0.0093±0.0015	65.22±0.97	46.80±0.18
pH8 μ0.06	14.4±0.6	0.111±0.012	6.87±0.66	0.00712±0.0015	67.75±0.65	50.72±0.18

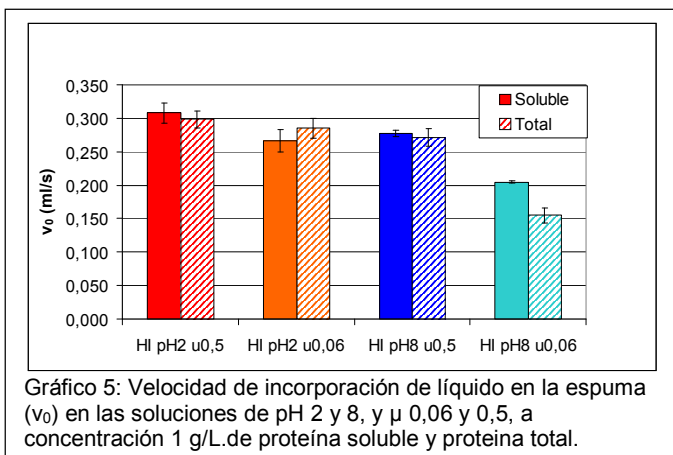
Tabla 3: Parámetros del modelado de la adsorción y reordenamiento, e interpolación del valor de la tensión superficial a los 3 s en las soluciones de pH 2 y 8, y μ 0,06 y 0,5 a concentración 1 g/L.

A pH 8 primó el proceso de reordenamiento dada la conformación nativa de las proteínas en esa condición y la necesidad de desplegarse en la interfase. A ambos pHs el incremento en la fuerza iónica aumentó la velocidad y magnitud del proceso de adsorción, de acuerdo con el enriquecimiento de la solución en partículas de menor tamaño.

Al analizar el descenso de la tensión interfacial a tiempos cortos (3 s), que interesan en la formación de la espuma, se pudo ver una correlación con el parámetro que evalúa la velocidad de la adsorción a la interfase (Gráfico 4)



Formación de la espuma



Para la proteína total se observó una mayor v_0 a pH 2 con respecto a pH 8 y a μ 0,5 con respecto a μ 0,06, sin detectarse una interacción entre ambos factores. Al reemplazarse proteína soluble por insoluble, trabajando con el total de las proteínas, no se observaron diferencias significativas en los valores de v_0 (Gráfico 5). La

densidad de la espuma formada a partir de proteína soluble fue mayor a pH 2 que a pH 8.





Imagen 1: Foto espuma HI pH 2 μ 0,5

Imagen 2: Foto espuma HI pH 2 μ 0,06

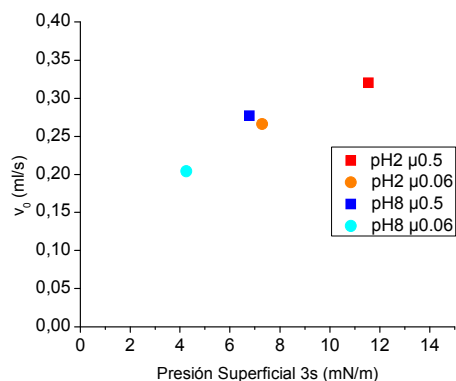


Gráfico 6: Relación entre la velocidad máxima de incorporación de líquido a la interfase y la presión superficial a los 3 s. en las soluciones de pH 2 y 8, y μ 0,06 y 0,5 a concentración 1 g/L.

Al analizar las imágenes de las espumas (Imagen 1, 2 ,3 y 4) no se aprecian diferencias significativas en los radios medios de las burbujas entre los distintos pHs. (actualmente estamos trabajando en el desarrollo de un algoritmo para obtener la distribución de tamaños de burbujas).

Analizando en conjunto el descenso de la tensión superficial a 3 s y la velocidad máxima de incorporación de líquido a la interfase (v_0) se encontró una relación lineal entre ambos parámetros.

DISCUSIÓN

Al analizar la composición polipeptídica de las dispersiones, se observa a pH 2 péptidos de menor tamaño que a pH 8, los cuales a su vez fueron menores que los constituyentes de las proteínas de reserva de las semillas de amaranto. Esto se podría explicar en base a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, los cuales han demostrado que en el aislado proteico de amaranto se encuentra una proteasa aspártica, presente en la semilla, la cual se encuentra activa a pH 2 (11). Esto permite pensar que la presencia de los numerosos péptidos de baja masa molecular, que constituyen la fracción soluble y total, no solo podrían deberse al efecto disociante propio del pH ácido sino también al efecto de esta proteasa

La solubilidad a ambos pHs descendió al aumentar la fuerza iónica, principalmente a pH 2. Este descenso puede ser atribuido al apantallamiento de las cargas superficiales que reduce la repulsión favoreciendo el agregado de las proteínas y la consecuente precipitación. De los espectros de dicroísmo circular y de la distribución de tamaño de partículas podemos deducir que a pH 2 precipitaron las partículas de mayor tamaño que se encontraban solubles a baja fuerza iónica, las cuales tenían una estructura secundaria desordenada. Esto conduce a un enriquecimiento de la solución de alta fuerza iónica en estructuras solubles de menores tamaños, más estructurada.

A pH 2 y baja fuerza iónica se observó el mayor período lag, lo cual podría ser debido al hecho que la proteína se encuentra formando estructuras de mayor tamaño que dificultaría el anclaje en la interfase. A alta fuerza iónica, donde los tamaños son menores, el período lag se redujo. No obstante en esta última condición la proteína presenta una conformación más estructurada y menos flexible, lo cual desfavorece el proceso de adsorción. Varios autores (24, 25; 26) han mostrado la existencia de una relación entre la flexibilidad molecular y la susceptibilidad de la molécula proteica a cambios conformacionales en la etapa de penetración a la interfase.

A concentraciones en las cuales la adsorción se vió limitada por la difusión, el valor de la constante aumentó con la concentración como era de esperar. El mayor valor se observó a pH 2, y a alta fuerza iónica, no existiendo interacción entre ambos factores. La misma tendencia se observó para la adsorción. Ambos fenómenos, la difusión y adsorción, se ven favorecidos por la presencia de partículas de menor tamaño, más hidrofóbicas y flexibles, que benefician el proceso desalentado por la condición de carga neta positiva (9, 27).

La constante de velocidad del proceso de adsorción de la proteína a la interfase comanda el incremento de la presión superficial a tiempos cortos. Este incremento es necesario para facilitar el aumento del área interfacial y la formación de la espuma. Se pudo observar que a mayor aumento de la presión, mayor fue la incorporación de líquido en la interfase (uno de los parámetros que permite evaluar la capacidad espumante). Según Prins y col (28) la mayor presión superficial al momento de formación de las burbujas, estas deberían ser de menor radio. Las medidas experimentales no permitieron detectar diferencias significativas entre las distintas muestras. No obstante se obtuvieron espumas más densas a pH 2 que a pH 8, esto se debería a la mayor densidad neta de cargas (29) lo cual mantendría una lamela más gruesa por repulsión de ambas interfaces.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Aiking, H. (2011). Future Protein Supply, Trends in Food Science & Technology, 22, 112-120.
- (2) Tavano, O. L., Da Silva Jr, S. I., Demonte, A., Neves, V. A. (2008). Nutritional responses of rats to diets based on chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed meal or its protein fractions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(22), 11006-11010.
- (3) Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J., Paredes-López, O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(22), 6515-6520.
- (4) Guzmán-Maldonado, S. H., Paredes-López, O. (1998). Production of high-protein flours as milk substitutes. In: J. R. Whitaker, F. Shahidi, A. López-Munguia, R. Y. Yada, G. Fuller, Functional Properties of Proteins and Lipids, vol. 708 (pp. 66-79). Washington D. C.: American Chemical Society.
- (5) Thanapornpoonpong, S. N., Vearasilp, S., Pawelzik, E., Gorinstein, S. (2008). Influence of various nitrogen applications on protein and amino acid profiles of amaranth and quinoa. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(23), 11464-11470.
- (6) Orsini Delgado, M.C., Tironi, V. A., Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. LWT-Food Science and Technology, 44(8), 1752-1760
- (7) Barrio, D.A., Añón, M.C.(2010). Potencial antitumoral properties of proteins isolated from Amaranth seeds. European Journal of Nutrition 49:73-82.
- (8) Nakai, S. I., Li-Chan, E. (1993). Recent advances in structure and function of food proteins. QSAR approach. Crit Rev Food Sci Nutr 33, 477-499.
- (9) Damodaran, S., Song, K. B. (1988). Kinetics of adsorption of proteins and interfaces-role of protein conformation in diffucional adsorption. Biochim Biophys Acta. 954(3), 253-264.
- (10) Husband FA, Garrood MJ, Mackie AR, Burnett GR, Wilde PJ. (2001) Adsorbed protein secondary and tertiary structures by circular dichroism and infrared spectroscopy with refractive index matched emulsions. J Agric Food Chem. 49(2):859-66.
- (11) Ventureira, J., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2010). Stability of oil/water emulsions of amaranth proteins. Effect of hydrolysis and pH. Food Hydrocolloids, 24(6/7), 551-559
- (12) Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(9), 2523-2530.
- (13) Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A. P., Paredes-López, O. (1994). Biochemistry of amaranth proteins. In O. Paredes-López (Ed.), Amaranth: Biology, chemistry and technology (pp. 75-106). Boca Raton, FL: CRC Press
- (14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.
- (15) Martínez, E. N., Castellani, O. F., Añón, M. C. (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3832-3839.
- (16) Kelly S. M., Price N. C. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. Biochim. Biophys Acta.; 1338: 161-185.

- (17) Provencher, S.W., (1982). A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Comput. Phys. Commun.*, 27(3), 213-227.
- (18) Benjamins, J., Cagna, A., Lucassen-Reynders, E., H. (1996). Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 114, 245-254.
- (19) Labourdenne, S., Gaudry-Rolland, N., Letellier, S., Lin, M., Cagna, A., Esposito, C., Verger, R., Riviere, C. (1994). The oil-drop tensiometer: potencial applications for studying the kinetics of (phospho)lipase action. *Chemistry and Physics of Lipids*, 71, 163-173.
- (20) Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R. (1999) Interfacial characteristics of food emulsifiers (proteins and lipids) at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 235-252.
- (21) Panizzolo, L.A., (2005). Tesis, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.
- (22) Loisel, W., Gueguen, J., Popineau, Y. (1993). A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins. In K. D. Schwenke, & R. Mothes (Eds.), *Food protein Structure and functionality* (pp. 320–335). New York: VCH Publishers.
- (23) Fainerman, V. B., Miller, R., (1998). Proteins at liquid interfaces in: D. Mobius, R. Miller (Eds.). *Studies of Interface Science*, vol. 7, (pp. 51-102). Elsevier, Amsterdam.
- (24) Cornec, M., Cho, D., Narsimhan, G., (1999). Adsorption dynamics of α -lactalbumin and β -lactoglobulin at air-water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 214, 129-142.
- (25) Razumosvky, L., Damodaran, S. (1999). Surface activity-compressibility relationship of proteins at the air-water interface. *Langmuir*, 15, 1392-1399.
- (26) Miller, R., Fainerman, V. B., Makievskia, A. V., Kragel, J., Grigorieva, D. O., Kazakovd, V. N., Sinyachenkod, O. V. (2000). Dynamics of protein and mixed protein surfactant adsorption layers at the water fluids interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 86, 39-82.
- (27) Sengupta, T., Razumovsky, L., Damodaran, S., (1999). Energetics of protein-interface interactions and its effect on protein adsorption. *Langmuir*, 15, 6991-7001.
- (28) Prins, A. (1988). Principles of foam stability. In E. Dickinson & G. Stainsby (Eds.), *Advances in food emulsions and foams* (pp. 91–122), Elsevier, London.
- (29) Ventureira, J. L., Bolontrade, A. J., Speroni, F. J., David-Briand, E., Scilingo, A. A., Ropers, M. H., Boury, F., Añón, M. C., Anton, M. (2011) Interfacial and emulsifying properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT Food Science and Technology*. (en prensa).